

文章编号: 1000-2243(1999)S0-0109-02

# 热敏相分离模拟酶催化荧光免疫分析法 测定乙肝表面抗原

杨黄浩, 朱庆枝, 李东辉, 陈秋影, 许金钧

(厦门大学化学系, 福建 厦门 361005)

摘要: 以聚 N-异丙基丙烯酰胺(PNIP)作为免疫反应载体, 以铁酞菁作为 HRP 的新型模拟酶来标记抗人 HBsAg 抗体, 建立了基于热相分离技术的夹心型荧光免疫分析 HBsAg 的方法. HBsAg 浓度在 20~5000 ng/mL 范围与体系的相对荧光强度呈良好线性关系. 检测限 8 ng/mL.

关键词: 模拟酶; 热敏高分子; 荧光; 免疫分析

中图分类号: O657.3

文献标识码: A

近年, 我们利用 PNIP 独特的热敏性质, 以氯化血红素为标记物, 建立了热敏相分离模拟酶催化荧光免疫分析方法<sup>[1, 2]</sup>. 本实验合成了四磺基铁酞菁和 PNIP, 以 PNIP 作为免疫反应载体, 建立了基于热相分离技术的夹心型荧光免疫分析 HBsAg 的新方法.

## 1 仪器及试剂

Hitachi 650-10S 荧光分光光度计; Shimadzu UV-240 紫外可见分光光度计; TGL-16G 型低温高速离心机; SHZ-88 台式恒温振荡器; Model PHS-301 pH 计; 四磺基铁酞菁由本实验室合成; N-异丙基丙烯酰胺(NIP)、N,N,N',N'-四甲基乙二胺(TEMED)、N-羟基琥珀酰亚胺丙烯酸酯(NAS)、对-羟基苯丙酸(p-HPPA), 东京化成. 所用试剂均为分析纯; 水为三次去离子水.

## 2 方法与结果

### 2.1 PNIP 的制备和抗人 HBsAg 抗体的固定化

取羊抗人 HBsAg 抗体 165  $\mu$ g, 加到 4 mL 磷酸缓冲生理盐水溶液中(PBS, pH=8.0), 加入 30  $\mu$ L 含 0.1% NAS 的二甲亚砷溶液, 将反应混合液置于 37  $^{\circ}$ C 水浴中恒温振荡 60 min. 反应混合液于 4  $^{\circ}$ C 透析 3 次, 除去未和抗体结合的游离 NAS. 向透析产物(NAS-Ab)溶液中加入 20 mg NIP 单体, 10 mg 过硫酸铵以及 10  $\mu$ L TEMED, 混合物在 25  $^{\circ}$ C 水浴中恒温振荡 2 h 后于 37  $^{\circ}$ C 水浴中恒温 10 min, 然后在 37  $^{\circ}$ C 空气浴中高速离心 10 min (12000 rpm/min), 倾掉上清液, 沉淀溶于冰冷的 PBS 中, 再于 37  $^{\circ}$ C 水浴中恒温 10 min, 高速离心. 如此重复 3 次, 最后将沉淀溶于冰冷的 PBS 中, 分装, 4  $^{\circ}$ C 保存备用.

### 2.2 铁酞菁标记抗人 HBsAg 抗体复合物的制备

收稿日期: 1999-06-17

作者简介: 杨黄浩(1975-), 男, 硕士研究生.

基金项目: 福建省自然科学基金资助项目(9810004); 国家教育部博士点基金资助项目

于 5mL 0. 2mol/L 碳酸盐缓冲液(pH=9. 5)中加入 20 $\mu$ L 33mg/mL 羊抗人 HBsAg 多克隆抗体, 备用. 称取 0. 2g 铁酞菁和 0. 4g PCl<sub>5</sub>, 在研钵中混匀, 于通风橱中研磨 5min, 加入 4mL 无水丙酮, 继续研磨 5min, 然后迅速将混合物过滤, 取滤液 0. 1mL 加入到抗人 HBsAg 抗体溶液中, 在 25℃下反应 6h. 将混合液透析过夜后, 用葡聚糖凝胶 G-50 柱层析. 收集洗脱下来的标记组分, 分装, 冷藏.

2. 3 夹心法免疫分析

向 1mL 离心管中加入 50 $\mu$ L PNIP-抗体(165 $\mu$ g/mL)和一定量的 HBsAg 标准溶液 (或待测血清), 25℃温育 1h, 按上述方法洗净. 再加入 40 $\mu$ L 标记抗体(390 $\mu$ g/mL), 25℃温育 1h, 再按上述方法洗净. 加入生荧底物, 反应 20min 后测量荧光强度.

2. 4 HBsAg 工作曲线

结果表明, 当 HBsAg 浓度在 20~5000ng/mL 范围内, 体系的相对荧光强度与 HBsAg 的浓度成良好的线性关系. 检测限 (3 $\sigma$ /S) 为 8ng/mL. 相关系数为 0. 9991.

2. 5 样品测定

利用上述方法对乙肝病人血清中的 HBsAg 含量进行测定, 并和酶联吸附免疫分析结果作了比较, 结果见表 1. 可以看出, 这 2 种方法的测定结果完全一致. 在对病人血清的检测中, 每批样品的批内相对标准偏差小于 5%. 该方法的可靠性用加入回收实验进行了验证, 结果令人满意.

表 1 乙肝病人血清中的 HBsAg 含量的测定

乙肝患者血清	HBsAg 含量/ ng $\cdot$ mL <sup>-1</sup>		RSD/ %	加入 HBsAg/ ng	回收率/ %
	本法	ELISA			
1	3835	+	2. 1	1000	102
2	4670	+	5. 0	1000	113

注: 本法测定为 6 次测定平均值; ELISA 结果由厦门市中医医院提供; “+” 表示乙肝表面抗原测定呈阳性

参考文献:

[ 1 ] Zhu Q Z, Liu F H, Xu J G, et al. Mimetic enzyme immunoassay using thermal phase separating polyme [ J ]. Analyst, 1998, 123: 1131 ~ 1134.  
[ 2 ] Zhu Q Z, Liu F H, Li D H, et al. A novel polymer-mimetic enzyme immunoassay system for  $\alpha$ -1-feto-protein based on thermal phase separating technique [ J ]. Anal Chim Acta, 1998, 375: 177.

Mimetic-Enzyme Fluoroimmunoassay for HBsAg Based on Thermal Phase Separating Technique

YANG Huang-hao, ZHU Qing-zhi, LI Dong-hui, CHEN Qiu-Ying, XU Jin-gou  
(Department of Chemistry, Xiamen University, Fujian Xiamen 361005, China)

**Abstract:** An anti-HBsAg antibody was conjugated to Poly-N-Isopropylacrylamide, and a novel polymer-mimetic enzyme fluoroimmunoassay method for the determination of HBsAg with sandwich format was proposed by using iron-tetrasulfonatophthalocyanine (FeTSPc) as a labelling reagent. The calibration graph for HBsAg was linear over the range of 20~5000ng/mL with a detection limit of 8ng/mL.

**Keywords:** mimetic enzyme; thermal phase separating polymer; fluorimetry; HBsAg